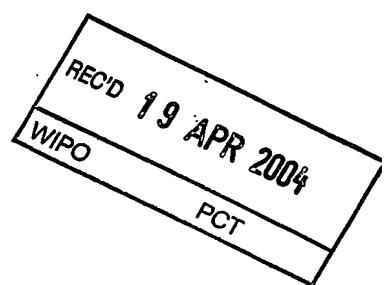


25.02.2004

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 103 04 219.9

**Anmeldetag:** 30.Januar 2003

**Anmelder/Inhaber:** Epigenomics AG, 10435 Berlin/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungsmustern mit hoher Sensitivität

**IPC:** C 12 Q 1/68

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 17. Februar 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
 Im Auftrag

Flemur

**Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungsmustern  
mit hoher Sensitivität**

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben.

10 Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebenen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschaltet wird, und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Gene in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw. des Genoms korrelierbar. Insofern äußern sich pathogene Zustände in einem veränderten Methylierungsmuster einzelner Gene oder des Genoms.

15 20 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

25 30 35 Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulfat mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer Hydroly-

se in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylycytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch "normale" molekularbiologische Techniken als einzige verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren zur Bisulfit-Behandlung definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 DEC 15;24(24):5064-6). Mit dieser Methode kann die DNA einzelner Zellen behandelt werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge behandelt, eine globale Behandlung von Zellen auf Tausenden von möglichen Regionen ist nicht möglich. Außerdem kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig umwandeln. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H. Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. Nucleic Acids Res. 1998 May 15;26(10):2255-64.

Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Dörfler W, Horsthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. Eur J Hum Genet. 1997 Mar-Apr;5(2):94-8) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek A, Walter J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. Nat Genet. 1997 Nov.;17(3):275-6) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine "Primer-Extension-Reaktion" (Gonzalgo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). Nucleic Acids Res. 1997 Jun. 15;25(12):2529-31, WO-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic Acids Res. 1997 Jun. 15;25(12):2532-4) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO 99 28498).

Harnstoff verbessert die Effizienz der Bisulfit-Behandlung vor der Sequenzierung von 5-Methylcytosin in genomischer DNA (Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA. Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. Nucleic Acids Res. 1998 Nov. 1;26(21):5009-10).

Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind:

Grigg G, Clark S. sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. Bioassays. 1994 Jun.;16(6):431-6, 431; Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke

B, Dörfler W. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. Hum Mol Genet. 1997

5 Mar;6(3):387-95; Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J, Reik W. Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphate genomic sequencing. Nucleic Acids Res. 1994 Feb. 25;22(4):695-6; Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R. Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. Gene. 1995 May 19;157(1-2):261-4; WO 97 46705, WO 95 15373 und WO 45560.

10 15 Ein weiteres bekanntes Verfahren ist die sogenannte methylierungssensitive PCR (Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. (1996), Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 3;93(18):9821-6).

20 25 Für dieses Verfahren werden Primer verwendet, die entweder nur an eine Sequenz hybridisieren, die durch die Bisulfit-Behandlung einer an der betreffenden Position unmethylierten DNA entsteht, oder aber umgekehrt Primer, welche nur an eine Nukleinsäure binden, die durch die Bisulfit-Behandlung einer an der betreffenden Position methylierten DNA entsteht. Mit diesen Primern können demnach Amplifikate erzeugt werden, deren Detektion wiederum Hinweise auf das Vorliegen einer methylierten oder unmethylierten Position in der Probe liefern, an welche die Primer binden.

30 35 Ein neueres Verfahren ist auch der Nachweis von Cytosin-Methylierung mittels einer Taqman PCR, das als MethylLight bekannt geworden ist (WO00/70090). Mit diesem Verfahren ist es möglich, den Methylierungsstatus einzelner oder weniger Positionen direkt im Verlauf der PCR nachzuwei-

sen, so dass sich eine nachfolgende Analyse der Produkte erübrigts.

5 Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung lässt sich aus einer im Januar 1999 erschienenen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999), der dort zitierten Literatur und dem US-Patent 5994065 über Methoden zur Herstellung von festen Trägern für Zielmoleküle wie  
10 Oligonukleotide bei verminderter nichtspezifischen Hintergrundsignal entnehmen.

15 Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoreszenz-markierte Sonden verwendet worden. Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben vielen anderen, kommerziell erhältlich.  
20

25 Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem. 1988 Oct. 15;60(20):2299-301). Ein Analyt wird in eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation des Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere.  
30  
35

MALDI-TOF Spektroskopie eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157.) Für Nukleinsäuren ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch die Matrix wesentlich ineffizienter. In der MALDI-TOF Spektroskopie spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es zwar mittlerweile einige ansprechende Matrices, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich durch einfache Alkylierungsschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 23: 1367-1373). Die Kopplung eines "charge tags" an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den gleichen Betrag, wie er für Peptide gefunden wird. Ein weiterer Vorteil von "charge tagging" ist die erhöhte Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.

Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen.

Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, p 9.16 - 9.19.

5 Es sind demnach bislang vielerlei Verfahren zur Methylierungsanalyse Stand der Technik. Die vorliegende Erfindung soll jedoch das Problem lösen, dass die gängigen Verfahren nicht in der Lage sind, eine in einer Körperflüssigkeit oder Serum befindliche zu untersuchende DNA gezielt 10 zu amplifizieren, wenn zugleich andere, sequenzhomologe DNA-Abschnitte anderen Ursprungs zugegen sind.

15 Die zu untersuchende DNA sowie die ansonsten vorhandenen, im folgenden Hintergrund-DNA genannten Nukleinsäuren, werden in aller Regel gleichermaßen amplifiziert, da die verwendeten Primer auch nicht in der Lage sind, zwischen zu untersuchender DNA und Hintergrund-DNA zu unterscheiden. Eine Möglichkeit zur Unterscheidung dieser DNAs ergibt sich jedoch durch das unterschiedliche Methylierungsmuster. Ein gängiges Verfahren ist die methylierungssensitive PCR, kurz MSP (Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. (1996), Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 3;93(18):9821-6). 20 Dieses Verfahren besteht aus mehreren Teilschritten. Zunächst wird eine dem Stand der Technik entsprechende Bisulfit-Behandlung durchgeführt, welche wiederum dazu führt, dass alle Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, während die methylierten Cytosinbasen (5-Methylcytosin) unverändert bleiben. Im nächsten Schritt verwendet man nun Primer, welche vollständig komplementär zu einer methylierten, mit Bisulfit umgewandelten DNA sind, nicht jedoch zu einer entsprechenden DNA welche 25 30 35 ursprünglich nicht methyliert vorlag. Das führt bei der Durchführung einer PCR mit einem solchen Primer dazu, dass ausschließlich die ursprünglich methylierte DNA

amplifiziert wird. Entsprechend ist es möglich, einen Primer zu verwenden, der im Gegenzug nur die unmethylierte DNA amplifiziert. Auf diese Art und Weise können, wenn zu analysierende DNA sowie Hintergrund DNA zugegen sind, ausschließlich die zu untersuchenden DNA Fragmente selektiv erzeugt werden, sofern sich diese hinsichtlich ihres Methylierungsstatus in einer CpG Position von der Hintergrund DNA unterscheiden. Stand der Technik ist es nun, aus dem Nachweis eines solchen zu untersuchenden DNA-Moleküls auf den Methylierungszustand oder das Vorliegen einer zu untersuchenden DNA rückzuschließen, was wiederum eine Diagnose beispielsweise einer Tumorerkrankung in Patienten prinzipiell erlaubt, da es bekannt ist, dass beispielsweise die Serum DNA-Konzentration sich in Tumorpatienten zum Teil drastisch erhöht. Nur die von den Tumoren stammende DNA soll dann neben der Hintergrund-DNA nachgewiesen werden. Prinzipiell vergleichbar ist die Analyse von DNA in anderen Körperflüssigkeiten.

Das hier geschilderte Verfahren, was als der nächstliegende Stand der Technik zu betrachten ist, hat jedoch einige Nachteile. Es ist beispielsweise nicht möglich, aus der Nachweisbarkeit eines amplifizierten Fragmentes zu untersuchender DNA auf die im Serum vorhandene Menge zu schließen. Schon geringste Mengen solcher DNA reichen aus, um ein positives Resultat zu erzielen, was zum einen ein Vorteil ist, sich aber auch sehr nachteilig auswirken kann, wenn man zum Beispiel den Effekt einer Tumorresektion auf die Serum DNA beurteilen will. Die größte Schwierigkeit ist jedoch, dass es viele CpG-Positionen gibt, welche sich hinsichtlich ihres Methylierungszustandes in der zu untersuchenden DNA und der Hintergrund-DNA nur graduell unterscheiden. Es ist offensichtlich, dass das existierenden MSP Verfahren nur dann durchgeführt werden kann, wenn man weiß, dass sich die Hintergrund-DNA von der zu untersuchenden DNA in der betreffenden CpG Po-

sition definitiv und zu 100% unterscheidet, will man nicht falsche positive Ergebnisse riskieren. Ist es dagegen in einem Tumorgewebe typisch, dass in z. B. 95 % der Tumorzellen eine bestimmte Position methyliert vorliegt, 5 in der ansonsten vorhandenen Hintergrund-DNA jedoch nur maximal 5% methyliert vorliegen, so ist es mit der MSP Methode nicht möglich, aussagekräftige Ergebnisse zu produzieren, da eine Quantifizierung der Templat-DNA mittels PCR prinzipiell nicht oder nur mit erhöhtem Aufwand möglich ist. Zudem liegt dieser Erfindung die Erkenntnis 10 zugrunde, dass es oft Muster von Methylierungszuständen in einem DNA-Fragment sind, die typisch für einen bestimmten Typ von Zellen, zum Beispiel einer Tumorzelle, sind.

15

Stand der Technik ist wiederum ein von Epigenomics entwickeltes Verfahren, welches zu untersuchende DNA und Hintergrund-DNA nach Bisulfit-Behandlung gleichermaßen amplifiziert und dann die im Fragment enthaltenen ehemaligen CpG Positionen durch Hybridisierungstechniken untersucht, alternativ mittels Mini-Sequenzierung oder anderen gängigen Verfahren. Dies hat den Vorteil, dass man ein quantitatives Bild bezüglich der untersuchten Methylierungspositionen erhält, d.h. es erfolgt die Bestimmung 20 des Methylierungsgrades einer Vielzahl von Positionen, was z. B. bei soliden Tumoren eine sehr genaue Klassifizierung ermöglicht. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass sie in den Fällen, in denen die Hintergrund-DNA stark überwiegt, keine genaue Aussage liefern kann, 25 da diese ja genau wie die zu untersuchende DNA amplifiziert wird und beide im Gemisch analysiert werden. Dieses Problem existiert nicht bei der Analyse von soliden Tumoren, wo man das zu untersuchende Material gezielt auswählen kann, es kann jedoch die Analyse von beispielsweise 30 Serum-DNA erschweren.

35

Ziel der vorliegenden Erfindung ist es nun, die Nachteile des Standes der Technik zu überwinden und die Vorteile beider Verfahren für die Detektion von Körperflüssigkeiten und Serum zu kombinieren. Dabei liegt ein besonderer Schwerpunkt auf dem bislang nicht gelösten Problem des Nachweises geringer Mengen nicht-methylierter DNA in Anwesenheit einer vergleichsweise großen Menge an Hintergrund-DNA.

- 10 Die Aufgabe wird dadurch gelöst, dass ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben geschaffen wird, bei dem man die folgenden Schritte ausführt: man behandelt eine genomische DNA-Probe, welche zu untersuchende DNA und Hintergrund-DNA umfasst, chemisch derart, dass alle nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, während die 5-Methylcytosinbasen unverändert bleiben,
- 15 man amplifiziert die chemisch behandelte DNA-Probe unter Verwendung von mindestens 2 Primeroligonukleotiden sowie einer Polymerase und eines Nukleotidgemisches, dessen Zusammensetzung zu einer Bevorzugung der zu untersuchenden DNA gegenüber der Hintergrund-DNA als Templat führt und man analysiert die Amplifikate und schließt aus dem Vorliegen oder der Produktmenge eines Amplifikates auf den Methylierungsstatus in der zu untersuchenden DNA.
- 20
- 25

In einer besonders bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens enthält das Nukleotidgemisch nur 2'-Desoxy-Guanosintriphosphat (dGTP), 2'-Desoxy-Adenosintriphosphat (dATP) und 2'-Desoxy-Thymidintriphosphat (dTTP). Es ist jedoch ebenfalls bevorzugt, dass das Nukleotidgemisch zudem eine verhältnismäßig geringe Konzentration an 2'-Desoxy-Cytidintriphosphat (dCTP) enthält. Besonders bevorzugt ist die dCTP Anfangskonzentration dann bei der Amplifika-

tion höchstens halb so hoch ist wie die durchschnittliche Anfangskonzentration der anderen drei Nukleotide.

5 In einer ebenfalls besonders bevorzugten Verfahrensvariante enthält das Nukleotidgemisch nur 2'-Desoxy-Cytidintriphosphat (dCTP), 2'-Desoxy-Adenosintriphosphat (dATP) und 2'-Desoxy-Thymidintriphosphat (dTTP). Es ist jedoch ebenfalls bevorzugt, dass das Nukleotidgemisch zudem eine verhältnismäßig geringe Konzentration an 2'-Desoxy-Guanosintriphosphat (dGTP) enthält. Besonders bevorzugt ist die dGTP Anfangskonzentration dann bei der Amplifikation höchstens halb so hoch wie die durchschnittliche Anfangskonzentration der anderen drei Nukleotide.

15

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird anstelle von 2'-Desoxy-thymidintriphosphat 2'-Desoxy-uridintriphosphat eingesetzt.

20

In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden zusätzlich terminierende Didesoxynukleotide eingesetzt.

25

Es ist zudem besonders bevorzugt, dass die Denaturierungstemperatur in der PCR-Amplifikation unter 90°C liegt.

30

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass man die Proben DNA aus Serum, Plasma, Urin, Sputum oder anderen Körperflüssigkeiten eines Individuums gewinnt.

35

Es ist weiterhin erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die Proben DNA aus Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Serum, Plasma, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Le-

ber, histologischen Objektträgern und allen möglichen Kombinationen hiervon gewinnt.

Es ist ganz besonders erfindungsgemäß bevorzugt, dass man  
5 die chemische Behandlung mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) durchführt. Bevorzugt ist es auch, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose erfolgt. Es ist auch und weiterhin bevorzugt, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist.  
10

Bevorzugt ist es, dass man die Amplifikation im zweiten Schritt in Gegenwart mindestens eines weiteren Oligonukleotids oder eines PNA-Oligomers durchführt, welches an ein 5'-CG-3'-Dinukleotid oder ein 5'-TG-3'-Dinukleotid oder ein 5'-CA-3'-Dinukleotid bindet, wobei das weitere Oligonukleotid oder PNA-Oligomer bevorzugt an die Hintergrund-DNA bindet und deren Amplifikation beeinträchtigt.  
15

20 Besonders bevorzugt ist es, dass diese Bindungsstelle des weiteren Oligonukleotids oder PNA-Oligomers mit den Bindungstellen der Primer auf der Hintergrund-DNA überlappt und das weitere Oligonukleotid das Binden mindestens eines Primeroligonukleotids an die Hintergrund-DNA behindert.  
25

30 Es ist wiederum besonders bevorzugt, dass mindestens zwei weitere Oligonukleotide oder PNA-Oligomere eingesetzt werden, wobei deren Bindungsstelle wiederum jeweils mit der Bindungsstelle eines Primers an die Hintergrund-DNA überlappt und die weiteren Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere das Binden beider Primeroligonukleotide an die Hintergrund-DNA behindern.  
35

Zudem ist es besonders bevorzugt, dass jeweils eines der weiteren Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere das Bin-

den des Forward-Primers behindert während das jeweils andere das Binden des Reverse-Primers behindert.

5 Besonders bevorzugt ist es, dass die weiteren Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere in mindestens der fünffachen Konzentration im Vergleich zu den Primeroligonucleotide vorliegen.

10 Weiterhin ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die chemisch behandelte DNA-Probe im zweiten Schritt unter Verwendung von mindestens 2 Primeroligonukleotiden und einem weiteren Oligonukleotid, welches an ein 5'-CG-3'-Dinukleotid oder ein 5'-TG-3'-Dinukleotid oder ein 5'-CA-3'-Dinukleotid hybridisiert, und mindestens einem Reporteroligonukleotid, welches an ein 5'-CG-3'-Dinukleotid oder ein 5'-TG-3'-Dinukleotid oder ein 5'-CA-3'-Dinukleotid hybridisiert, sowie einer Polymerase amplifiziert; wobei das weitere Oligonukleotid bevorzugt an die Hintergrund-DNA bindet und deren Amplifikation beeinträchtigt, und wobei das Reporteroligonukleotid bevorzugt an die zu untersuchende DNA bindet und deren Amplifikation anzeigt. Dabei ist es vorteilhaft, dass man zusätzlich zu dem Reporteroligonukleotid ein weiteres mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiertes Oligomer verwendet, welches unmittelbar benachbart zu dem Reporteroligonukleotid hybridisiert und sich diese Hybridisierung mittels Fluoreszenz Resonanz Energietransfer nachweisen lässt. Weiterhin vorteilhaft ist es, dass ein Taqman-Assay durchgeführt wird. Bevorzugt ist es auch, dass ein Lightcycler Assay durchgeführt wird. Bevorzugt ist es auch, dass ein Assay unter Verwendung von Molecular Beacons durchgeführt wird.

35 In einer weiteren besonders bevorzugten Verfahrensvariante binden die weiteren Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere an die Hintergrund-DNA und behindern damit die

vollständige Primeroligonukleotid-Verlängerung in der Polymerasereaktion. Dabei ist es wiederum besonders bevorzugt, dass die verwendete Polymerase keine 5'-3'-Exonuklease-aktivität aufweist. Eine weitere bevorzugte Variante ist es, dass die weiteren Oligonukleotide am 5'-Ende modifiziert vorliegen und damit von einer Polymerase mit 5'-3'-Exonuklease-aktivität nicht signifikant abgebaut werden können.

10 In einer besonders bevorzugten Variante unterscheiden die Primer selbst zwischen zu untersuchender DNA und Hintergrund-DNA. In einer wiederum besonders bevorzugten Verfahrensvariante liegt die Hintergrund DNA methyliert vor, und die zu untersuchende DNA liegt unmethyliert vor, jeweils an Positionen, an die mindestens ein Primer für die Amplifikation bindet, wobei der oder die Primer bevorzugt an die zu untersuchende DNA binden.

15 Sollen die Primer die zu untersuchende DNA bevorzugt amplifizieren, so enthalten diese also bevorzugt TG oder respektive CA Sequenzen an Positionen, die vor der Bisulfit Behandlung CG Sequenzen entsprachen. Dadurch amplifizieren die Primer keine ehemals methylierten, noch CG-haltigen Sequenzen und damit unter diesen Bedingungen idealerweise keine Hintergrund DNA. Dies verstärkt den durch das Nukleotidgemisch hervorgerufenen Effekt der Bevorzugung der nicht methylierten zu untersuchenden DNA in der Amplifikation.

20 25 Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist es, dass man in der Amplifikation zusätzlich mindestens ein Reporteroligonukleotid verwendet, dessen Fluoreszenzeigenschaften sich in Folge der Amplifikation verändern. In einer wiederum besonders bevorzugten Variante des Verfahrens führt man einen Taqman-Assay oder ein LightCycler-Assay oder einen Assay unter Verwendung von Molecular Beacons durch.

Es ist ferner erfindungsgemäß bevorzugt, dass die zusätzlich zu den Primern verwendeten Oligonukleotide nicht über eine 3'-OH Funktion verfügen. Weiterhin ist bevorzugt, dass die Reporteroligonukleotide mindestens eine Fluoreszenzmarkierung tragen. Ferner ist auch bevorzugt, dass die Reportermoleküle die Amplifikation entweder durch eine Zunahme oder eine Abnahme der Fluoreszenz anzeigen. Dabei ist es besonders vorteilhaft, dass man die Zunahme oder Abnahme der Fluoreszenz auch direkt zur Analyse verwendet und aus dem Fluoreszenzsignal auf einen Methylierungszustand der zu analysierenden DNA schließt.

Bevorzugt ist es erfindungsgemäß ferner, dass die Hintergrund-DNA in 100 facher Konzentration im Vergleich zur zu untersuchenden DNA vorliegt. Weiterhin ist bevorzugt, dass die Hintergrund-DNA in 1000 facher Konzentration im Vergleich zur zu untersuchenden DNA vorliegt.

Weiterhin ist bevorzugt, dass man aus dem Methylierungsgrad an den verschiedenen untersuchten CpG-Positionen auf das Vorliegen einer Erkrankung oder eines anderen medizinischen Zustandes des Patienten schließt.

Vorteilhaft ist es, dass die Amplifikate selbst für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versehen sind. Weiterhin vorteilhaft ist es, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind oder/und dass die Markierungen Radionuklide sind oder/und dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

Bevorzugt ist ferner, dass bei der Amplifikation einer der Primer an eine Festphase gebunden ist.

Erfindungsgemäß ist es auch, dass die Amplifikate insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen werden und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung eines erfundungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

25 Bevorzugt ist auch die Verwendung eines erfundungsgemäßen Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

30

Bevorzugt ist auch die Verwendung eines erfundungsgemäßen Verfahrens zur Klassifizierung von Patienten in Untergruppen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, Primern für die Amplifikation und einem Nukleotidgemisch, das entweder nur 2'-Desoxy-Guanosintriphosphat (dGTP), 2'-  
5 Desoxy-Adenosintriphosphat (dATP) und 2'-Desoxy-Thymidintriphosphat (dTTP) enthält, aber kein dCTP, oder nur eine verhältnismäßig geringe Konzentration an 2'-Desoxy-Cytidintriphosphat (dCTP) enthält. Besonders bevorzugt ist die Konzentration an dCTP höchstens halb so hoch wie die durchschnittliche Konzentration der anderen drei Nukleotide.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, Primern für die Amplifikation und einem Nukleotidgemisch, das entweder nur 2'-Desoxy-Cytidintriphosphat (dCTP), 2'-  
15 Desoxy-Adenosintriphosphat (dATP) und 2'-Desoxy-Thymidintriphosphat (dTTP) enthält, aber kein dGTP, oder nur eine verhältnismäßig geringe Konzentration an 2'-Desoxy-Guanosintriphosphat (dGTP). Besonders bevorzugt  
20 ist die Konzentration an dGTP höchstens halb so hoch wie die durchschnittliche Konzentration der anderen drei Nukleotide.

25 Die vorliegende Erfindung beschreibt somit ein Verfahren zur Detektion des Methylierungszustandes genomicscher DNA Proben. Im Gegensatz zu bislang bekannten Verfahren wird der Methylierungsgrad eines Satzes von CpG Positionen in einer ausgewählten Untergruppe von DNA-Fragmenten z. B. in Serum, Plasma, Urin oder Sputum bestimmt, so dass eine Analyse auch in Gegenwart eines Überschusses an diagnostisch nicht relevanter Hintergrund-DNA möglich ist. Insbesondere gelingt mit dem erfindungsgemäßen Verfahren der selektive Nachweis von nicht methylierter, zu untersuchender DNA in Gegenwart eines Überschusses an diagnostisch nicht relevanter, methylierter Hintergrund-DNA.

Dies konnte mit vergleichbaren Verfahren bislang nicht gezeigt werden.

5 Dabei besteht das bevorzugte Verfahren wiederum aus mehreren Schritten, die sich wie folgt zusammenfassen lassen:

Zuerst werden dem Patienten Serum und/oder andere Körperflüssigkeiten entnommen und die darin befindliche DNA so weit erforderlich isoliert. Anschließend wird im zweiten Schritt eine chemische Behandlung, bevorzugt mit einem Bisulfit (=Hydrogensulfit, Disulfit) durchgeführt, wobei beispielsweise alle nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, die methylierten Cytosinbasen (5-Methylcytosin) jedoch unverändert bleiben. Im dritten Verfahrensschritt wird nun eine Amplifikation durchgeführt, bei der bevorzugt die zu untersuchende DNA amplifiziert wird, nicht aber oder nur in geringerem Maße die Hintergrund-DNA. Dabei führt ein besonders angepasstes Nukleotidgemisch, wie oben beschrieben, zu der Bevorzung der zu untersuchenden DNA in der Amplifikation, oder trägt zumindest dazu bei. Besonders bevorzugt wird auch die Denaturierungstemperatur so angepasst, dass bevorzugt die ursprünglich nicht methylierte DNA aufgeschmolzen wird, die ursprünglich methylierte DNA jedoch doppelsträngig verbleibt. Im folgenden, vierten Schritt werden nun die amplifizierten Fragmente detektiert. Es ist auch möglich, sie weiter im Detail auf Ihre Methylierungssignatur hin zu analysieren und den Methylierungsgrad mehrerer ehemaliger CpG Positionen in den Amplifikaten zu bestimmen. Im fünften Verfahrensschritt wird aus dem Methylierungsgrad an den verschiedenen untersuchten CpG Positionen oder aus dem Vorliegen eines Amplifikates oder aus der gebildeten Menge dieses Amplifikates allein auf das Vorliegen einer Erkrankung oder eines anderen medizinischen Zustandes des Patienten geschlossen.

5 Der erste Schritt des Verfahrens, die Gewinnung von Proben, erfolgt bevorzugt durch Entnahme von Körperflüssigkeiten wie z. B. Sputum, Urin, Plasma oder aber Serum, jedoch ist es offenkundig dass das Verfahren mit vielerlei Proben aus unterschiedlichen Quellen durchführbar ist, die hier ohne Anspruch auf Vollständigkeit aufgeführt sind.

10  
15 Bevorzugt wird die in dem Verfahren eingesetzte genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Serum, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hier-von umfassen.

20  
25 Es erfolgt in einigen Fällen vor der Bisulfit-Behandlung eine Aufreinigung oder Aufkonzentration der DNA, um eine Störung der Bisulfit-Reaktion und/oder der nachfolgenden PCR durch ein zu hohes Maß an Verunreinigungen zu vermeiden. Es ist jedoch bekannt, dass beispielsweise eine PCR aus Gewebe nach Behandlung beispielsweise mit Proteinase K ohne weitere Aufreinigung erfolgen kann, und dies gilt sinngemäß auch für die Bisulfit-Behandlung und nachfol-gende PCR.

30  
35 Die chemische Behandlung wird bevorzugt durch Behandlung mit einem Bisulfit (=Hydrogensulfit, Disulfit), wiederum bevorzugt Natriumbisulfit (weniger geeignet ist Ammonium-bisulfit) durchgeführt. Entweder erfolgt die Reaktion nach einer publizierten Variante, bevorzugt ist hier die Einbettung der DNA in Agarose, um die DNA während der Be-

handlung in einzelsträngigen Zustand zu halten, oder aber nach einer neuen Variante durch Behandlung in Gegenwart eines Radikalfängers und eines denaturierenden Reagenzes, bevorzugt ein Oligoethylenglykoldialkylether oder beispielweise Dioxan. Vor der PCR Reaktion werden die Reagenzien entweder durch Waschen im Falle der Agarosemethode oder einem DNA-Aufreinigungsverfahren (Stand der Technik, Fällung oder Bindung an eine Festphase, Membran) entfernt oder aber einfach durch Verdünnung in einen Konzentrationsbereich gebracht, der die PCR nicht mehr signifikant beeinflusst.

Im dritten Schritt des Verfahrens wird eine Amplifikation der bisulfit-behandelten DNA durchgeführt. Die Amplifikationsmethode bevorzugt dabei die zu untersuchende DNA im Vergleich zur Hintergrund-DNA. Dabei wird durch Variation der Nukleotidkonzentration in der PCR eine solche Bevorzugung erreicht. Schon bei gleicher Konzentration aller 4 Nukleotide in der PCR kann es zu einer ungleichen Amplifikation ehemals methylierter und unmethylierter DNA kommen. Auch wenn in einer PCR-Reaktion diese Bevorzugung in einem Amplifikationszyklus gering ausfällt, so kann sich nach den üblichen 30-40 Zyklen dennoch ein erheblicher Bias hinsichtlich der Amplifikationseffizienz ergeben. Grundlegende Idee der vorliegenden Erfindung ist es nun, sich diesen im allgemeinen unerwünschten Effekt zunutze zu machen, indem man eine Bevorzugung der zu untersuchenden DNA im Vergleich zur Hintergrund DNA durch Adaption der PCR-Bedingungen verschärft. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich dabei besonders für die bevorzugte Amplifikation nicht methylierter DNA gegenüber methylierter Hintergrund-DNA. Insbesondere die relative Konzentration der Nukleotide zueinander soll hier geändert werden, um einen solchen Bias zugunsten der ursprünglich nicht methylierten DNA zu erreichen. Wird nicht methylierte DNA mit Bisulfit behandelt, so ergibt sich nach der Amplifi-

kation ein Fragment, das sehr viel weniger CG Basenpaare enthalten kann als ein Fragment, dass aus einer entsprechenden methylierten DNA erzeugt wurde. Eine Bevorzugung der nicht methylierten DNA wird also in der vorliegenden Erfindung dadurch erreicht, dass der PCR-Reaktion wesentlich weniger dCTP und/oder dGTP zugesetzt wird als dATP und dGTP. Dadurch dass die dCTP und dGTP Nukleotide also limitierend werden in der PCR, wird die an C und G ärmere zu untersuchende DNA gegenüber der Hintergrund-DNA bevorzugt.

Analog kann auch auf anderem Wege eine Bevorzugung der zu untersuchenden DNA durch Veränderung der Nukleotidzusammensetzung erreicht werden. So können z.B. terminierende Nukleotidtriphosphate, wie beispielsweise Dideoxyderivate, in geringen Konzentrationen eingesetzt werden. Selbige führen durch Abbruch der Kettenverlängerung in der Polymerasreaktion zu einer verminderten Amplifikationseffizienz, aber wiederum wird die Hintergrund-DNA in der Amplifikation dadurch stärker beeinträchtigt als die nicht methylierte zu untersuchende DNA, wenn beispielsweise ddCTP oder ddGTP als Terminatoren ausgewählt werden.

Eine weitere Adaption der PCR-Bedingungen kann durch die Veränderung der Denaturierungstemperatur erfolgen. Eine niedrigere Denaturierungstemperatur begünstigt wiederum die ursprünglich nicht methylierte DNA, da diese bei sonst gleicher Sequenz weniger C/G Basenpaare enthält. Die ursprünglich methylierte DNA wird daher unter diesen Bedingungen nur unvollständig aufgeschmolzen und steht im folgenden Amplifikationszyklus nicht als Templat zur Verfügung.

Besonders bevorzugt werden die Änderung der Denaturierungstemperatur und die oben beschriebenen Änderungen in der Nukleotidzusammensetzung kombiniert eingesetzt, um schließlich eine Amplifikation der Hintergrund DNA über mehrere Zyklen praktisch vollständig zu unterdrücken.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch bevorzugt in Kombination mit einer geeigneten Methode (wie z.B. MSP) und dazu passenden Methylierungspositionen verwendet werden, die auch ansonsten die selektive Amplifikation der zu untersuchenden DNA erlauben. Die Auswahl der betreffenden CpG Positionen erfolgt dabei nach der Prämisse, dass sie sich zwischen Hintergrund-DNA und zu untersuchender DNA hinsichtlich ihrer Methylierung so sehr wie möglich unterscheiden sollten. Dazu werden bevorzugt zunächst die Methylierungsprofile der jeweils in Frage kommenden Abschnitte eines Gens sowohl für die zu untersuchenden Tumore als auch für die Hintergrund-DNA aus gesunden Individuen bestimmt. Diejenigen Positionen, die die größten Unterschiede zwischen Tumor DNA und Hintergrund-DNA (beispielsweise im Serum) aufweisen, werden als Methylierungspositionen ausgewählt, die von genannten Methoden unterschieden werden sollen. Solche Positionen sind für eine Vielzahl von Genen bereits bekannt, beispielsweise für GSTpi, für HIC-1 und MGMT (von Wronski MA, Harris LC, Tano K, Mitra S, Bigner DD, Brent TP. (1992) Cytosine methylation and suppression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression in human rhabdomyosarcoma cell lines and xenografts. Oncol Res.;4(4-5):167-74; Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. (2000), Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. Cancer Res. May 1;60(9):2368-71).

Nach der selektiven Amplifikation der zu untersuchenden DNA können nun bevorzugt, nach an sich bekannten Verfahren, der Methylierungsstatus mehrerer weiterer CpG-Positionen bestimmt werden. Dabei ist der Bias der Amplifikation zu berücksichtigen, es kann in diesem Falle also

in erster Linie um eine Bestätigung des Ergebnisses aus der Amplifikation gehen.

Es ist jedoch offensichtlich, dass auch in diesem Fall das Entstehen eines PCR Fragmentes selbst im Einzelfall von hinreichender Aussagekraft sein kann, sofern man, wie auch bei der MSP, die Situation vorliegen hat, dass die bereits in der Amplifikation untersuchte Position praktisch zu 100% beispielsweise in der Hintergrund-DNA unmethyliert vorliegt, jedoch in der zu untersuchenden DNA aufmethyliert vorliegt. Dies kann im Einzelfall bereits hinreichend für eine Diagnose sein.

Bevorzugt ist es, dass in einer PCR-Reaktion mehrere Fragmente gleichzeitig erzeugt werden, d.h. dass eine Multiplex-PCR durchgeführt wird. Bei deren Design muss darauf geachtet werden, dass nicht nur die Primer, sondern auch eventuell weitere eingesetzte Oligonukleotide nicht zueinander komplementär sein dürfen. Jedoch hat man bei bisulfit-behandelter DNA den Vorteil, dass aufgrund des unterschiedlichen G- und C-Gehaltes der beiden DNA-Stränge ein Forward-Primer niemals auch als Reverse-Primer fungieren kann, was die Multiplexierung erleichtert.

Im einfachsten Fall werden nun die entstandenen Fragmente nachgewiesen. Dazu kommen alle möglichen bekannten molekulargenetischen Verfahren in Frage, wie Gelelektrophorese, Sequenzierung, Flüssigchromatographie oder Hybridisierungen. Dies wäre auch zur Qualitätskontrolle der vorangehenden Verfahrensschritte denkbar. Wie oben ausgeführt, ist jedoch die nachfolgende Analyse des Methylierungsgrades weiterer CpG-Positionen besonders bevorzugt.

Detektionstechniken, die sich dafür besonders eignen, sind die Hybridisierung an Oligomerarrays und beispielsweise Primer-Extension (MiniSequenzierung) Reaktionen.

Die Hybridisierung an Oligomerarrays kann ohne weitere Veränderung von Protokollen gegenüber dem nächstliegenden Stand der Technik verwendet werden (Olek A, Olek S, Walter J; WO-Patent 9928498). Jedoch ist es bevorzugt, die Amplifizate an einen Array von Oligomeren zu hybridisieren, der aus Paaren von an einer Festphase immobilisierten Oligonukleotiden besteht, von denen eines jeweils stark bevorzugt an einen ein ursprünglich unmethyliertes CpG enthaltenden DNA-Abschnitt hybridisiert und das andere wiederum stark bevorzugt an den entsprechenden Abschnitt, in dem ursprünglich ein methyliertes CpG enthalten war, jeweils vor der Bisulfit-Behandlung und Amplifikation. Besonders bevorzugt ist in diesem Fall das Amplifikat oder die Amplifizate fluoreszent oder radioaktiv oder mit ablösbarer Massentags markiert, so dass sich nach der Hybridisierung die an die beiden Oligonukleotide eines Paares gebundenen Fragmente anhand dieser Markierung nachweisen und quantifizieren lassen. Man erhält ein Intensitätsverhältnis, aus dem man beispielsweise nach Eichung des Experiments mit vollständig methylierter und unmethylierter DNA den Methylierungsgrad an der jeweiligen CpG-Position bestimmen kann, wobei hier wiederum der Bias in der Amplifikation zu berücksichtigen ist. Auf einem solchen Oligomer-Array lässt sich eine Vielzahl von Fragmenten gleichzeitig nachweisen. Es ist sinnvoll und bevorzugt, dass der Array auch Oligomere zur Kontrolle des Experiments enthält, da so beispielsweise das Verhältnis der in die Analyse eingehenden zu untersuchenden DNA zur Hintergrund-DNA bestimmt werden kann.

Primerextensionsreaktionen können ebenfalls an auf einer Festphase immobilisierten Oligonukleotide ausgeführt werden. Obgleich nicht zwingend erforderlich, ist die Immobilisierung dieser Primer bevorzugt, da in der Regel eine Vielzahl von CpG-Positionen aus mehreren Amplifikaten untersucht werden soll und dies auf einer Festphase, also

an einem Oligomerarrays, bedeutend leichter und in einem Experiment durchführbar ist. Es ist besonders bevorzugt, dass die Primer sich unmittelbar neben einer zu untersuchenden CpG-Position befinden und dass die Verlängerung nur um ein Nukleotid erfolgt. Es ist besonders bevorzugt, dass lediglich Didesoxythymidin und Didesoxycytidin als Nukleotide zugesetzt werden und dass diese jeweils mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, wobei allerdings auch andere, unterscheidbare Markierungen wie Massentags denkbar und bevorzugt sind. Nach einer Bisulfit-Behandlung und Amplifikation liegen ehemalige methylierte CG als CG und nicht methylierte CG nunmehr als TG vor. Die Primerextensionsreaktion führt daher entweder zum Einbau eines Didesoxycytidins oder Didesoxythymidins. Aus dem Verhältnis der für diese beiden Terminatoren jeweils detektierten Fluoreszenzmarkierungen lässt sich auf die Methylierung der jeweiligen Position schließen. Es ist auch möglich und bevorzugt, in diesem Fall die Primerextension mit Desoxycytidin und Desoxythymidin durchzuführen, wenn man kein Guaninderivat zugibt und demzufolge bei einer TG oder CG Sequenz bereits nach einer Base die Primerextension ohnehin endet. Zudem ist es ebenfalls bevorzugt, die Analyse auf dem Gegenstrang durch Unterscheidung von CA und CG analog durchzuführen, dann entsprechend mit Didesoxy-ATP und Didesoxy-GTP oder deren Derivaten. Die Auswahl der Positionen und die der Terminatoren und Nukleotide in der Primerverlängerungsreaktion muss mit der Auswahl der Nukleotide und Reaktionsbedingungen in der erfundungsgemäßen Amplifikation abgestimmt werden. Die sinnvollen und sinnlosen Kombinationen werden für den Fachmann offensichtlich sein.

Eine besonders bevorzugte Variante des Verfahrens ist die Analyse von CpG-Positionen durch Verwendung von Taqman oder Lightcycler-Technologievarianten unmittelbar während der Amplifikation. Dabei werden zusätzlich zu den

Oligonukleotiden, die für die Amplifikation der zu untersuchenden DNA sorgen, weitere fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide zugesetzt, und die Änderung der Fluoreszenz während der PCR-Reaktion gemessen. Dabei erhält man überwiegend, weil ja hauptsächlich die zu untersuchende DNA amplifiziert wird, auch aus dieser Fluoreszenzänderung unmittelbar Information über den Methylierungsstatus verschiedener CpG Positionen. Da verschiedene Oligonukleotide bevorzugt jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen versehen werden, ist auch eine Unterscheidung der Fluoreszenzänderung während der PCR getrennt für verschiedene Positionen und Fragmente möglich.

Diese damit vom Methylierungsstatus abhängige Fluoreszenzänderung kann durch zahlreiche Methoden erzielt werden, von denen hier beispielhaft zwei aufgeführt werden sollen.

Zum einen können bevorzugt Oligonukleotid Sonden verwendet werden, die spezifisch entweder an eine Sequenz binden, die durch chemische Behandlung aus einer an der entsprechenden Position unmethylierten DNA hervorgegangen ist, oder aber entsprechend an einer Sequenz, die durch chemische Behandlung aus einer an der entsprechenden Position methylierten DNA hervorgegangen ist. Diese Sonden sind besonders bevorzugt mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen versehen, einem Quencherfarbstoff und einem als Marker dienenden Fluoreszenzfarbstoff. Beide sind mit der gleichen Oligonukleotidsonde verknüpft. Findet nun eine PCR-Reaktion mit der zu untersuchenden DNA als Templat statt, so wird die PCR Reaktion diesmal durch die fluoreszent markierte Oligomersonde blockiert. Da diese jedoch nicht gegen die Nukleaseaktivität der Polymerase resistent ist, findet ein Abbau der an die Templat-DNA gebundenen Sonde während der PCR-Reaktion statt, der mit der Bindungseffizienz der Sonde an das Templat korreliert, da die nicht

gebundene Sonde von der Polymerase nicht abgebaut wird. Der Abbau der Sonde wird nun dadurch, dass dabei der Quencherfarbstoff und der als Marker dienende Fluoreszenzfarbstoff voneinander getrennt werden, durch eine 5 Zunahme der Fluoreszenz des Markerfarbstoffs unmittelbar sichtbar. Im Prinzip handelt es sich hierbei um eine Variante des sogenannten Taqman Assays.

Was man demnach misst, ist das Entstehen eines PCR Produktes aus der zu untersuchenden DNA, jedoch nur dann wenn die untersuchte Position auch in dem Methylierungszustand vorliegt, den die Sonde durch Hybridisieren an die chemisch behandelte DNA detektieren kann. Eine Gegenprobe mit einer Sonde, die entsprechend an die betreffende CpG-Position im anderen Methylierungszustand binden würde, ist daher zweckmäßig und bevorzugt. 10  
15

Bevorzugt werden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen an mehreren Sonden zusammen mit dem Quencher eingesetzt, um eine Unterscheidbarkeit der Sonden und damit eine Multiplexierung zu erreichen. 20

Auch bei einem solchen Assay werden an die betreffende CpG-Position bindende Oligonukleotide eingesetzt, die eine signifikante Amplifikation der Hintergrund-DNA verhindern. Die Amplifikation der zu untersuchenden DNA kann auch derart analysiert werden, dass man die gleiche Position auch mit einer Sonde wie oben beschrieben untersucht und die Amplifikation demnach durch eine an die betreffende CpG-Position bindende Sonde nachweist. In diesem Fall ist es besonders bevorzugt, dass das nicht abbaubare Oligonukleotid selektiv an die Hintergrund-DNA bindet, während die fluoreszenzmarkierte Sonde an die zu untersuchende DNA bindet. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens weisen dabei die Sonde und das nicht 25  
30  
35

abbaubare Oligonukleotid bis auf bevorzugt eine, nicht aber mehr als zwei Nukleobasen die gleiche Sequenz auf.

5 Bevorzugt ist es auch, dass mit einer Sonde mehrere Positionen gleichzeitig auf ihren Methylierungsgrad untersucht werden können.

10 Ist eine genauere Quantifizierung des Methylierungsgrades einer Position wünschenswert, so können bevorzugt auch zwei mit einander konkurrierende Sonden mit unterschiedlichen Farbstoffen eingesetzt werden, wobei eine wiederum im Fall einer unmethylierten Position in der zu untersuchenden DNA, die andere umgekehrt im Falle einer methylierten Position bevorzugt bindet. Aus dem Verhältnis der Fluoreszenzzunahmen für die beiden Farbstoffe lässt sich dann wiederum auf den Methylierungszustand der untersuchten Position schließen, aber auch auf die erfolgreiche Durchführung der für die zu untersuchende DNA spezifischen Amplifikation.

15 Ein grundsätzlich anderes Verfahren, bei dem jedoch auch während der PCR eine Fluoreszenzänderung erfolgt, ist gegenwärtig als LightCycler™ Technologie bekannt. Dabei wird ausgenutzt, dass ein Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen zwei Farbstoffen nur erfolgen kann, wenn diese sich in unmittelbarer Nähe, das heißt 1-5 Nukleotide voneinander entfernt befinden. Nur dann kann der zweite Farbstoff von der Emission des ersten Farbstoffes angeregt werden und dann seinerseits Licht einer anderen Wellenlänge emittieren, das dann detektiert wird.

30 35 Im vorliegenden Fall der Methylierungsanalyse erfolgt eine Hybridisierung einer fluoreszenzmarkierten Sonde an die betreffende chemisch behandelte DNA an eine CpG-

Position, und die Bindung dieser Sonde hängt wiederum davon ab, ob die zu untersuchende DNA an dieser Position vor der Bisulfit-Behandlung methyliert oder unmethyliert vorlag. Unmittelbar benachbart zu dieser Sonde bindet eine weitere Sonde mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff. Diese Bindung erfolgt bevorzugt wiederum methylierungsabhängig, wenn in dem betreffenden Sequenzabschnitt eine weitere methylierbare Position vorliegt. Während der Amplifikation wird nun die DNA vermehrt, weshalb immer mehr fluoreszenzmarkierte Sonden benachbart an die betreffende Position binden, sofern diese den dafür erforderlichen Methylierungszustand aufwies, und daher ein zunehmender FRET gemessen wird.

- 15 Auch bei diesem Verfahren erfolgt bevorzugt eine Multiplexierung mit mehreren verschiedenen fluoreszenzmarkierten Sonden.
- 20 Zusammenfassend ist ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben besonders bevorzugt, bei welchem die folgenden Schritte ausgeführt werden: Zuerst wird eine genomische DNA-Probe, welche zu untersuchende DNA und Hintergrund-DNA umfasst, chemisch derart behandelt, dass alle nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, während die 5-Methylcytosinbasen unverändert bleiben, dann wird die chemisch behandelte DNA-Probe unter Verwendung von mindestens 2 Primeroligonukleotiden sowie einer Polymerase amplifiziert, wobei die zu untersuchende DNA gegenüber der Hintergrund-DNA als Templat bevorzugt wird und im nächsten Schritt werden die Amplifikate analysiert und aus dem Vorliegen eines Amplifikates und/oder aus der Analyse weiterer Positionen auf den Methylierungsstatus in der zu untersuchenden DNA geschlossen.

In einer besonders bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen enthält das Nukleotidgemisch nur 2'-Desoxy-Guanosintriphosphat (dGTP), 2'-Desoxy-Adenosintriphosphat (dATP) und 2'-Desoxy-Thymidintriphosphat (dTTP). Es ist jedoch ebenfalls bevorzugt, dass das Nukleotidgemisch zudem eine verhältnismäßig geringe Konzentration an 2'-Desoxy-Cytidintriphosphat (dCTP) enthält. Besonders bevorzugt ist die dCTP Anfangskonzentration dann bei der Amplifikation höchstens halb so hoch wie die durchschnittliche Anfangskonzentration der anderen drei Nukleotide.

In einer ebenfalls besonders bevorzugten Verfahrensvariante enthält das Nukleotidgemisch nur 2'-Desoxy-Cytidintriphosphat (dCTP), 2'-Desoxy-Adenosintriphosphat (dATP) und 2'-Desoxy-Thymidintriphosphat (dTTP). Es ist jedoch ebenfalls bevorzugt, dass das Nukleotidgemisch zudem eine verhältnismäßig geringe Konzentration an 2'-Desoxy-Guanosintriphosphat (dGTP) enthält. Besonders bevorzugt ist die dGTP Anfangskonzentration dann bei der Amplifikation höchstens halb so hoch wie die durchschnittliche Anfangskonzentration der anderen drei Nukleotide.

In einer weiteren, besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird die Denaturierungstemperatur in der PCR so verändert, dass die zu untersuchende DNA aufgeschmolzen wird, nicht aber die Hintergrund-DNA.

In einer besonders bevorzugten Verfahrensvariante erfolgt die Analyse oder die weitere Analyse mittels Hybridisierung an Oligomer-Arrays, wobei Oligomere Nukleinsäuren oder in ihren Hybridisierungseigenschaften ähnliche Moleküle wie PNAs sein können. Bevorzugt hybridisieren die Oligomere über einen 12-22 Basen langen Abschnitt an die

zu analysierende DNA und umfassen ein CG, TG oder CA Dinukleotid. Mit dieser Methode wird bevorzugt der Methylierungsstatus von mehr als 20 Methylierungspositionen der zu untersuchenden DNA in einem Experiment nachgewiesen, besonders bevorzugt sind es mehr als 60 Methylierungspositionen.

5 Besonders bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem die weitere Analyse durch Längenmessung der amplifizierten zu untersuchenden DNA erfolgt, wobei Methoden zur Längenmessung Gelelektrophorese, Kapillargelelektrophorese, Chromatographie (z.B. HPLC), Massenspektrometrie und andere geeignete Methoden umfassen.

10 Besonders bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem die weitere Analyse durch Sequenzierung erfolgt, wobei Methoden zur Sequenzierung die Sanger-Methode, Maxam-Gilbert-Methode und andere Methoden wie Sequencing by Hybridisation (SBH) umfassen. Wiederum bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Sequenzierung (nach Sanger) für jede oder eine kleine Gruppe von CpG Positionen mit jeweils einem separaten Primeroligonukleotid ausgeführt wird und die Verlängerung der Primer nur eine oder einige wenige Basen ausmacht, und aus der Art der Primerverlängerung auf den Methylierungsstatus der betreffenden Positionen in der zu untersuchenden DNA geschlossen wird.

15 Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die weitere Analyse durch Sequenzierung erfolgt, wobei Methoden zur Sequenzierung die Sanger-Methode, Maxam-Gilbert-Methode und andere Methoden wie Sequencing by Hybridisation (SBH) umfassen. Wiederum bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Sequenzierung (nach Sanger) für jede oder eine kleine Gruppe von CpG Positionen mit jeweils einem separaten Primeroligonukleotid ausgeführt wird und die Verlängerung der Primer nur eine oder einige wenige Basen ausmacht, und aus der Art der Primerverlängerung auf den Methylierungsstatus der betreffenden Positionen in der zu untersuchenden DNA geschlossen wird.

20 Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die weitere Analyse durch Sequenzierung erfolgt, wobei Methoden zur Sequenzierung die Sanger-Methode, Maxam-Gilbert-Methode und andere Methoden wie Sequencing by Hybridisation (SBH) umfassen. Wiederum bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Sequenzierung (nach Sanger) für jede oder eine kleine Gruppe von CpG Positionen mit jeweils einem separaten Primeroligonukleotid ausgeführt wird und die Verlängerung der Primer nur eine oder einige wenige Basen ausmacht, und aus der Art der Primerverlängerung auf den Methylierungsstatus der betreffenden Positionen in der zu untersuchenden DNA geschlossen wird.

25 Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die weitere Analyse durch Sequenzierung erfolgt, wobei Methoden zur Sequenzierung die Sanger-Methode, Maxam-Gilbert-Methode und andere Methoden wie Sequencing by Hybridisation (SBH) umfassen. Wiederum bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Sequenzierung (nach Sanger) für jede oder eine kleine Gruppe von CpG Positionen mit jeweils einem separaten Primeroligonukleotid ausgeführt wird und die Verlängerung der Primer nur eine oder einige wenige Basen ausmacht, und aus der Art der Primerverlängerung auf den Methylierungsstatus der betreffenden Positionen in der zu untersuchenden DNA geschlossen wird.

30 Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die weitere Analyse durch Sequenzierung erfolgt, wobei Methoden zur Sequenzierung die Sanger-Methode, Maxam-Gilbert-Methode und andere Methoden wie Sequencing by Hybridisation (SBH) umfassen. Wiederum bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Sequenzierung (nach Sanger) für jede oder eine kleine Gruppe von CpG Positionen mit jeweils einem separaten Primeroligonukleotid ausgeführt wird und die Verlängerung der Primer nur eine oder einige wenige Basen ausmacht, und aus der Art der Primerverlängerung auf den Methylierungsstatus der betreffenden Positionen in der zu untersuchenden DNA geschlossen wird.

35 Besonders bevorzugt sind auch die Amplifikate selbst für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versehen. Bei diesen Markierungen handelt es sich bevorzugt um

Fluoreszenzmarkierungen, Radionuklide oder ablösbare Massenmarkierungen, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

5 Weiterhin ist ein Verfahren bevorzugt, bei dem bei der Amplifikation einer der Primer an eine Festphase gebunden ist.

10 Auch bevorzugt ist eine Verfahrensvariante, wobei die Amplikate insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen werden und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines der beschriebenen Verfahren zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Zudem bevorzugt ist die Verwendung eines der beschriebenen Verfahren zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, Primern und einem Nukleotidgemisch zur Herstellung der Amplifikate, sowie optional einer Anleitung zur Durchführung zumindest einer der beschriebenen Verfahrensvarianten.
- 10

Dabei besteht der Kit zumindest aus drei Reagenzien, dem Bisulfit-Reagenz, dem Nukleotidgemisch sowie den Primern, die einzeln oder als Gemisch enthalten sein können.

15 Das Nukleotidgemisch umfasst bevorzugt nur 2'-Desoxy-Guanosintriphosphat (dGTP), 2'-Desoxy-Adenosintriphosphat (dATP) und 2'-Desoxy-Thymidintriphosphat (dTTP). Es ist jedoch ebenfalls bevorzugt, dass das Nukleotidgemisch zudem eine verhältnismäßig geringe Konzentration an 2'-Desoxy-Cytidintriphosphat (dCTP) enthält. Besonders bevorzugt ist die dCTP Konzentration höchstens halb so hoch wie die durchschnittliche Konzentration der anderen drei Nukleotide.

20  
25  
30  
35

Das Nukleotidgemisch umfasst ebenfalls bevorzugt nur 2'-Desoxy-Cytidintriphosphat (dCTP), 2'-Desoxy-Adenosintriphosphat (dATP) und 2'-Desoxy-Thymidintriphosphat (dTTP). Es ist jedoch ebenfalls bevorzugt, dass das Nukleotidgemisch zudem eine verhältnismäßig geringe Konzentration an 2'-Desoxy-Guanosintriphosphat (dGTP) enthält. Besonders bevorzugt ist die dGTP Konzentration höchstens halb so hoch wie die durchschnittliche Konzentration der anderen drei Nukleotide.

Das Nukleotidgemisch kann auch Didesoxynukleotide enthalten. Zudem kann der Kit Pufferkomponenten für die Amplifikation und/oder die Bisulfitreaktion enthalten.

5

Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung:

Herstellung der Templat-DNA und Etablierung einer methylierungssensitiven PCR für GSTp1

10

Als Templat-DNA dienen humane DNA aus peripherem Blut (Promega, Madison USA), unbehandelt und *in vitro* enzymatisch methyliert, die einer Bisulfit-Behandlung unterzogen wurde, sowie entsprechende nicht methylierte DNA, die ebenfalls einer Bisulfit-Behandlung unterzogen wurde. Für die Methylierung aller CG-Dinukleotid wurden 6 µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 150 µl mit SssI (New England Biolabs, Frankfurt/Main) nach Herstellerangaben umgesetzt. Die Bisulfit-Behandlung erfolgte nach einem publizierten Verfahren (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphate based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 DEC 15;24(24):5064-6).

20

Ein 153 bp GSTp1 Fragment (Position 1242-1393 in Sequenz Acc-Nr M24485.1 ) wurde mit den Bisulfit-DNA spezifischen Primer 2cf GTTTT(CT)GTTATTAGTGAGT und 2cr

TCCTAAATCCCCCTAAACC in einem Reaktionsvolumen von 25 µl (1x Reaktionspuffer, Qiagen; 1 U HotstarTaq, Qiagen; dNTPs jedes 200 µM, ausser dCTP 75 µM, jeder Primer 500 nM , 0,05-10 ng Bisulfit-behandelte Templat-DNA) unter folgenden PCR-Bedingungen (95 °C - 15 min; 46 Zyklen: 88.5 °C - 0:45 min, 52 °C - 0:45 min, 72 °C - 0:20 min; 72 °C - 10 min) amplifiziert. Durch Sequenzierung der GSTp1 Fragmente konnte gezeigt werden, dass humane DNA aus peripherem Blut für dieses Fragment keine methylierten CG-Dinukleotide hat, wogegen in der SssI-behandelten DNA al-

25

30

35

le CG-Dinukleotide in der methylierten Form vorliegen. Es kann gezeigt werden, dass die PCR für die nicht methylierte DNA bei gleicher Anfangskonzentration deutlich effizienter abläuft als für die methylierte DNA, für die unter den gewählten Bedingungen praktisch kein nachweisbares Produkt erhalten wurde.

5

10

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in  
5 DNA-Proben, dadurch gekennzeichnet, dass man die folgenden Schritte ausführt:  
man behandelt eine genomische DNA-Probe, welche zu untersuchende DNA und Hintergrund-DNA umfasst, chemisch derart, dass alle nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, während die 5-Methylcytosinbasen unverändert bleiben,  
10 man amplifiziert die chemisch behandelte DNA-Probe unter Verwendung von mindestens 2 Primeroligonukleotiden sowie einer Polymerase und eines Nukleotidgemisches, dessen Zusammensetzung zu einer bevorzugten Amplifikation der zu untersuchenden DNA gegenüber der Hintergrund-DNA führt und  
15 man schließt aus dem Vorliegen oder der Produktmenge eines Amplifikates auf den Methylierungsstatus in der zu untersuchenden DNA.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleotidgemisch nur 2'-Desoxy-Guanosintriphosphat (dGTP), 2'-Desoxy-Adenosintriphosphat (dATP) und 2'-Desoxy-Thymidintriphosphat (dTTP) enthält.  
25
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleotidgemisch zudem eine verhältnismäßig geringe Konzentration an 2'-Desoxy-Cytidintriphosphat (dCTP) enthält.  
30
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die dCTP Anfangskonzentration bei der Amplifikation höchstens halb so hoch ist wie die durchschnitt-  
35

liche Anfangskonzentration der anderen drei Nukleotide in besagtem Nukleotidgemisch.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleotidgemisch nur 2'-Desoxy-Cytidintriphosphat (dCTP), 2'-Desoxy-Adenosintriphosphat (dATP) und 2'-Desoxy-Thymidintriphosphat (dTTP) enthält.
- 10 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleotidgemisch zudem eine verhältnismäßig geringe Konzentration an 2'-Desoxy-Guanosintriphosphat (dGTP) enthält.
- 15 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die dGTP Anfangskonzentration bei der Amplifikation höchstens halb so hoch ist wie die durchschnittliche Anfangskonzentration der anderen drei Nukleotide in besagtem Nukleotidgemisch.
- 20 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass anstelle von 2'-Desoxy-thymidintriphosphat 2'-Desoxy-uridintriphosphat eingesetzt wird.
- 25 9. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass terminierende Didesoxy-nukleotide in der Amplifikation eingesetzt werden.
- 30 10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Denaturierungstemperatur in der PCR-Amplifikation unter 90°C liegt.
- 35 11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Proben-DNA aus

Serum, Plasma, Urin, Sputum oder anderen Körperflüssigkeiten eines Individuums gewinnt.

12. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die chemische Behandlung mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfat) durchführt.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose erfolgt.
14. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist.
15. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Amplifikation in Gegenwart mindestens eines weiteren Oligonukleotids oder eines PNA-Oligomers durchführt, welches an ein 5'-CG-3'-Dinukleotid oder ein 5'-TG-3'-Dinukleotid oder ein 5'-CA-3'-Dinukleotid bindet, wobei das weitere Oligonukleotid oder PNA-Oligomer bevorzugt an die Hintergrund-DNA bindet und deren Amplifikation beeinträchtigt.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass diese Bindungsstelle des weiteren Oligonukleotids oder PNA-Oligomers mit den Bindungstellen der Primer auf der Hintergrund-DNA überlappt und das weitere Oligonukleotid oder PNA-Oligomer somit das Binden mindestens eines Primeroligonukleotids an die Hintergrund-DNA behindert.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei weitere Oligonukleotide oder PNA-Oligomere eingesetzt werden, wobei deren Bindungsstelle wiederum jeweils mit der Bindungsstelle eines Primers an die Hintergrund-DNA überlappt und besagte weitere Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere somit das Binden beider Primeroligonukleotide an die Hintergrund-DNA behindern.
- 5 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die weiteren Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere in mindestens der fünffachen Konzentration im Vergleich zu den Primeroligonukleotiden vorliegen.
- 10 19. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die verwendete Polymerase keine 5'-3' Exonukleaseaktivität aufweist.
- 15 20. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die weiteren Oligonukleotide am 5'-Ende modifiziert vorliegen und damit von einer Polymerase mit 5'-3' Exonukleaseaktivität nicht signifikant abgebaut werden können.
- 25 21. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Primer in der Amplifikation zwischen zu untersuchender DNA und Hintergrund-DNA unterscheiden.
- 30 22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Hintergrund DNA methyliert vorliegt, und die zu untersuchende DNA unmethyliert vorliegt, jeweils an Positionen, an die mindestens ein Primer für die Amplifikation bindet, wobei der oder die Primer nach
- 35

der chemischen Behandlung bevorzugt an die zu untersuchende DNA binden.

- 5        23. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man in der Amplifikation zusätzlich mindestens ein Reporteroligonukleotid verwendet, dessen Fluoreszenzeigenschaften sich in infolge der Amplifikation verändern.
- 10      24. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass ein Taqman-Assay oder ein LightCycler-Assay oder ein Assay unter Verwendung von Molecular Beacons durchgeführt wird.
- 15      25. Verfahren nach einem der Ansprüche 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Reporteroligonukleotid mindestens eine Fluoreszenzmarkierung trägt.
- 20      26. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Reporteroligonukleotid oder die Reporteroligonukleotide die Amplifikation entweder durch eine Zunahme oder eine Abnahme der Fluoreszenz anzeigt bzw. anzeigen.
- 25      27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass man die Zunahme oder Abnahme der Fluoreszenz auch direkt zur Analyse verwendet und aus dem Fluoreszenzsignal auf einen Methylierungszustand der zu analysierenden DNA schließt.
- 30      28. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Hintergrund-DNA in 100 facher Konzentration im Vergleich zur zu untersuchenden DNA vorliegt.

29. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Hintergrund-DNA in 1000 facher Konzentration im Vergleich zur zu untersuchenden DNA vorliegt.
- 5
30. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man aus dem Methylierungsgrad an den verschiedenen untersuchten CpG Positionen auf das Vorliegen einer Erkrankung oder eines anderen medizinischen Zustandes des Patienten schließt.
- 10
31. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikate selbst für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versehen sind.
- 15
32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind.
- 20
33. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Radionuklide sind.
- 25
34. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.
- 30
35. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass bei der Amplifikation einer der Primer an eine Festphase gebunden ist.
- 35
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikate insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen werden und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.

37. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranste-henden Ansprüche zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressions-symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädi-gungen; psychotische Störungen und Persönlichkeits-störungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehl-funktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabo-lische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopf-schmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.
38. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranste-henden Ansprüche zur Klassifizierung von Patienten in Untergruppen.
39. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranste-henden Ansprüche zur Unterscheidung von Zelltypen o-der Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferen-zierung.

40. Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenden Reagenz, Primern für die Amplifikation und einem Nukleotidgemisch gemäss einem der Ansprüche 2 bis 8.

## Zusammenfassung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben, bei dem man die folgenden Schritte ausführt:

10 man behandelt eine genomische DNA-Probe, welche zu untersuchende DNA und Hintergrund-DNA umfasst, chemisch derart, dass alle nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, während die 5-Methylcytosinbasen unverändert bleiben,

15 man amplifiziert die chemisch behandelte DNA-Probe unter Verwendung von mindestens 2 Primeroligonukleotiden sowie einer Polymerase und eines Nukleotidgemisches, dessen Zusammensetzung zu einer Bevorzugung der zu untersuchenden DNA gegenüber der Hintergrund-DNA als Templat führt und man schließt aus dem Vorliegen oder der Produktmenge eines Amplifikates auf den Methylierungsstatus in der zu untersuchenden DNA.